

УДК 632.3

С. И. Приходько, И. Н. Писарева, К. П. Корнев

*Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР»),
140150, Россия, Московская область,
Раменский район, г. Раменское,
р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32,
svetlana.prik@yandex.ru*

ДИАГНОСТИКА ОПАСНОЙ КАРАНТИННОЙ БАКТЕРИИ *XYLELLA FASTIDIOSA* WELLS ET AL.

Ключевые слова: диагностика, бактериоз, ПЦР, чувствительность, специфичность.

Xylella fastidiosa является карантинным вредным организмом, отсутствующим на территории ЕАЭС и вызывает такие заболевания растений, имеющие экономическое значение как: бактериоз (болезнь Пирса) винограда, пестрый хлороз цитрусовых, болезнь «фони» персика, ожог листьев сливы, синдром быстрого усыхания оливковых деревьев, ожоги листьев миндаля, кофе, олеандра, пекана, черники и некоторых видов парковых деревьев. По данным EFSA в 2020 году количество поражаемых *X. fastidiosa* растений составило 595 различных видов [1, 2]. Экономический ущерб, связанный с заболеваниями, вызванными *X. fastidiosa*, ежегодно оценивается в миллионы долларов [2]. Диагностика возбудителя бактериоза (болезнь Пирса) винограда в импортном посадочном материале имеет огромное значение для предупреждения интродукции фитопатогена на территорию РФ. Целью данных исследований является подбор, апробация и совершенствование существующих методов выявления и идентификации возбудителя бактериоза винограда (болезнь Пирса) из растительного материала.

Материалы и методы. Для определения чувствительности тестов использовали 9 разведений тотальной ДНК, извлеченной из зараженных *X. fastidiosa* олив. Постановка опыта проводилась в 4-х кратной повторности. Для экстракции ДНК использовали готовый набор «ФитоСорб-Автомат-48» (ЗАО «Синтол»), выделение ДНК проводили на автоматической станции Freedom EVO (Тесан, Швейцария) [3].

Авторами были испытаны и оптимизированы 5 тестов ПЦР «в реальном времени»: по Harper et al., 2010 (erratum 2013); по Francis et al., 2006; по Ouyang et al., 2013 (M); по Li et al., 2013; набор «Фитоскрин. *Xylella fastidiosa*-PB» (ЗАО «Синтол»), а также классический ПЦР-тест по Minsavage et al., 1994 [4].

Результаты. Было установлено, что все тесты одинаково эффективно выявляют возбудителя в четырех повторностях 5-го разведения (100%). При этом более ранние циклы были получены при тестировании коммерческого набора «Фитоскрин. *Xylella fastidiosa*-PB» и ПЦР-PB по Ouyang et al., (2013 (M)). Тем не менее, наиболее стабильные результаты показали диагностические системы по Harper et al., (2010) и Francis et al. (2006). Данные тесты детектировали ДНК возбудителя в 6-м разведении в 3-х повторностях из 4-х (75%).

Диагностическая система «Фитоскрин» детектировала ДНК патогена в двух повторностях 6-го разведения (50%). ПЦР-PB в соответствии с Ouyang et al. (2013 (M)) и Li et al. (2013) в 6-м разведении ДНК фитопатогена не выявили. На рисунке показаны

сравнительные данные пороговых циклов детекции ДНК *X. fastidiosa* в 5-ти разведениях всех испытанных ПЦР-РВ.

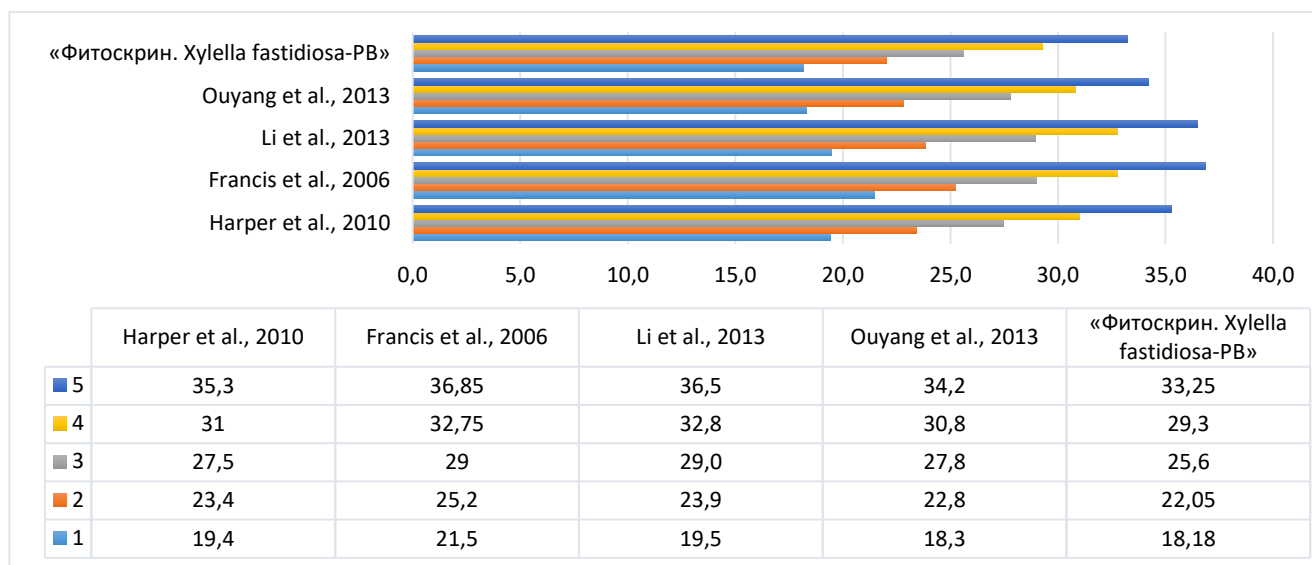


Рисунок. Сравнение чувствительности различных ПЦР-тестов для выявления *X. fastidiosa* по среднему значению порогового цикла в пяти разведениях ДНК

Наименьшую чувствительность имеет классическая ПЦР в соответствии с Minsavage et al. (1994). Порогом выявления ДНК возбудителя болезни Пирса для данной тест-системы является 4-е разведение ДНК и при этом фрагменты четко визуализируются. Для проверки специфичности тестов использовали ДНК чистых культур 51 штамма сапрофитных и фитопатогенных бактерий. Установлена высокая специфичность тестов ПЦР-РВ. Испытание классической ПЦР по Minsavage et al., (1994) показало наличие кросс-реакции с штаммом *Acidovorax citruli* и амплификацию неспецифичного фрагмента с ДНК *Ralstonia piketti*, *Pseudomonas putida*, *Ochrobactrum* sp., *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Таким образом, в ходе исследований определены наиболее эффективные методы для диагностики возбудителя – это «Фитоскрин. *Xylella fastidiosa*-РВ» и ПЦР-РВ в соответствии с Harper et al., (2010). Остальные тесты могут применяться в качестве подтверждающих в случае положительного результата или же при идентификации изолятов бактериальных культур.

Список литературы

1. Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature searches up to 30 June 2019. Scientific report, EFSA. 2020. P. 1–61.
2. Sicard A., Zeilinger A.R., Vanhove M. et al. // Annual Review of Phytopathology. 2018. Vol. 56. P. 9.1–9.22
3. Писарева И. Н., Приходько С. И., Корнев К. П. // Карантин растений. Наука и практика. 2019. Т. 4(30). С. 30–33.
4. PM 7/024 (4) *Xylella fastidiosa* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2019. Vol. 49(2). P. 175–227.